目次

目次 1
Tables 1
Figures 2
略語一覧及び用語の定義 3
1. 非臨床試験計画の概要 5
1.1 PKU における高フェニルアラニン血症 5
1.2 PKU の病態生理と特徴 5
1.3 PKU の臨床管理 6
1.4 Sepiapterin の作用機序 6
1.5 Sepiapterin の非臨床開発プログラム 6
2. 薬理試験 8
2.1 効力を裏付ける試験 8
2.2 副次的薬理試験 10
2.3 安全性薬理試験 10
3. 動物での薬物動態及び薬物代謝 12
3.1 吸収 12
3.2 分布 13
3.3 代謝 14
3.4 排泄 17
3.5 薬物動態学的薬物相互作用 17
4. 毒性試験 19
4.1 反復投与毒性試験 23
4.2 遺伝毒性試験 27
4.3 がん原性試験 27
4.4 生殖発生毒性 27
4.5 その他の毒性試験 28
5. 総括及び結論 30
6. 参考文献 34

Tables

Table 1. Sepiapterin の非臨床安全性評価における毒性試験及びそれぞれの NOAEL の一覧 20
Table 2. 反復投与試験における主な毒性所見及び sepiapterin 経口投与による BH_4 の全身曝露量 25
Table 3. 臨床用量 60 mg/kg/日で得られた臨床 BH_4 曝露量に対する非臨床 BH_4 曝露量（倍数）の要約 33

Figures

Figure 1. Sepiapterin の推定主要代謝経路.....15
Figure 2. ラット、ミニブタ、サル及びヒトの肝臓及び腎臓の S9 画分における sepiapterin の推定主要代謝経路.....16

略語一覧及び用語の定義

略語又は特殊な用語	用語	説明
AGMO	alkyglycerol monooxygenase	アルキルグリセロールモノオキシゲナーゼ
AR	aldose reductase	アルドース還元酵素
$AUC_{0\text{-}24h}$	area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose	投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}48h}$	area under the concentration-time curve from time 0 to 48 hours postdose	投与後 0 時間から 48 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}last}$	area under the concentration-time curve from time 0 to time of the last quantifiable measurement or the last sample collection time	0 時間から最終定量可能時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積
BDC	bile duct cannulated	胆管カニューレ挿入
BH_2	7,8-dihydrobiopterin	7,8-ジヒドロビオプテリン
BH_4	Tetrahydrobiopterin	テトラヒドロビオプテリン
BH_4-OH	4α-hydroxy-tetrahydrobiopterin	4α-ヒドロキシテトラヒドロビオプテリン
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク質
BQL	below the quantifiable limit	定量限界未満
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
CNS	central nervous system	中枢神経系
CR	carbonyl reductase	カルボニル還元酵素
CYP450	cytochrome P450	チトクロム P450
DALA	Drug Abuse Liability Assessment	薬物乱用傾向評価
DCoH1	dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1α	肝細胞核因子 1α の二量体化補因子
DHFR	dihydrofolate reductase	ジヒドロ葉酸還元酵素
DHPR	dihydropteridine reductase	ジヒドロプテリジン還元酵素
DP	drug product	製剤
DRF	dose range-finding	用量設定
DS	drug substance	原薬
ENT	equilibrative nucleoside transporter	平衡型ヌクレオシドトランスポーター
EuPFI	European Paediatric Formulation Initiative	欧州小児用製剤イニシアチブ
F	Female	雌
FEED	fertility and early embryonic development	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験
FOB	functional observation battery	機能観察総合評価法
GD	gestation day	妊娠日齢
GI	Gastrointestinal	消化器の
H_2N	Azanide	アザニド
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
HPA	Hyperphenylalaninemia	高フェニルアラニン血症
HSDH2	3α-hydroxysteroid dehydrogenase type 2	3α-ヒドロキシステロイド脱水素酵素 2 型
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
IK_r	rapid delayed rectifier potassium current	急速活性型遅延整流カリウム電流
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
M	Male	雄
MAD	Mutual Acceptance of Data	データの相互受入れ

略語又は特殊な用語	用語	説明
MATE	multidrug and toxin extrusion	多剤排出輸送体
MDR1	multidrug resistance protein 1	多剤耐性タンパク質 1
MRHD	maximum recommended human dose	最大推奨臨床用量
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NA	not applicable	該当せず
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
n.e.	non-enzymatic	非酵素的
NOEL	no observed effect level	無影響量
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NOS	nitric oxide synthase	一酸化窒素合成酵素
NZW	New Zealand White	ニュージーランド白色
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
PAH	phenylalanine hydroxylase	フェニルアラニン水酸化酵素
PCD	pterin-4α-carbinolamine dehydratase	プテリン-4α-カルビノールアミン脱水酵素
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク
Phe	phenylalanine	フェニルアラニン
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PKU	phenylketonuria	フェニルケトン尿症
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (Japan)	独立行政法人医薬品医療機器総合機構
PND	postnatal day	生後日齢
PPND	pre- and postnatal development	出生前及び出生後の発生試験
(Q)SAR	quantitative structure activity relationship	定量的構造活性相関
S9 代謝活性化系	aroclor 1254-induced rat liver microsomal enzymes	アロクロール 1254 誘導ラット肝ミクロソーム酵素
SmPC	Summary of Product Characteristics	製品概要
SR	sepiapterin reductase	Sepiapterin 還元酵素
TH	tyrosine hydroxylase	チロシン水酸化酵素
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
TPH	tryptophan hydroxylases	トリプトファンヒドロキシラーゼ
TRA	total radioactivity	総放射能
TTC	threshold of toxicological concern	毒性学的懸念の閾値
US	United States	米国
WOE	weight of evidence	証拠の重み付け
XH_2	7,8-dihydroxanthopterin	7,8-ジヒドロキサントプテリン
XO	xanthine oxidase	キサンチンオキシダーゼ

1. 非臨床試験計画の概要

PTC Therapeutics（PTC）社は、sepiapterin（旧名：PTC923 及び CNSA-001）を開発中である。Sepiapterin は、テトラヒドロビオプテリン（BH_4）の天然の前駆体である生体内で生成される内因性 sepiapterin と構造的に同一の外部合成品である。

Sepiapterin の申請適応症は、小児及び成人におけるフェニルケトン尿症（PKU）である。

1.1 PKU における高フェニルアラニン血症

高フェニルアラニン血症（HPA）は、血中フェニルアラニン（Phe）濃度の持続的な上昇として定義される代謝疾患である。原発性 HPA は、フェニルアラニン水酸化酵素（PAH）の酵素活性欠損によって引き起こされる遺伝疾患の一群で、Phe の代謝障害並びに血中及び他の組織内で Phe の蓄積をもたらす（Smith and Lee 2000, de Baulny 2007）。ほとんどの場合（被験者の 98%）、HPA は常染色体潜性疾患として遺伝する PAH 遺伝子の変異に起因する。関連する表現型は重症度が様々で、治療前の血中 Phe 濃度及び 1 日当たりの食事性 Phe 耐性の代謝表現型に基づいて分類される（Camp 2014, Hillert 2020）。これらのグループの定義及び全体に占める各グループの世界的な推定割合は以下のとおりである。

- 古典的 PKU：治療前の血中 Phe 濃度が 1,200 µmol/L 超と定義され、世界的な分布は 62%と推定される。
- 軽症 PKU：治療前の血中 Phe 濃度が 600～1,200 µmol/L と定義され、世界的な分布は 22%と推定される。
- 軽症 HPA：治療前の血中 Phe 濃度が 120～600 µmol/L と定義され、世界的な分布は 16%と推定される。

1.2 PKU の病態生理と特徴

PAH 酵素は、Phe からチロシンへの変換の初期の律速段階を触媒し、必須補因子である BH_4 に依存する。PAH は 3 つのドメインからなり、非対称二量体を構成するタンパク質である。この複雑な構造により、基質の親和性及び活性化を微調整できる一方で、PAH は特にタンパク質ミスフォールディングを受けやすい（Flydal 2019）。PKU において、ミスフォールド立体配置を有する PAH バリアントの発現は、PAH の機能低下と関連する（Gersting 2008, Gersting 2010）。

補因子としての役割を有する BH_4 は、PAH に対する分子シャペロンとして作用し、PAH タンパク質合成時にミスフォールディングからこのタンパク質を保護したり、3 次元構造の再構築を促進したりする。したがって、PAH 又は BH_4 のいずれかの欠損は、中枢神経系（CNS）における Phe の蓄積を引き起こし、未治療の患者では、強い神経毒性を有するケトン体の生成及び不可逆的神経機能障害が認められる（Al Hafid and Christodoulou 2015, Blau and Longo 2015）。

未治療のまま放置すると、進行性の発達遅延及び重度で不可逆的な知的障害が生じる可能性がある。その他の症状として、痙攣発作、筋運動異常、筋緊張、反射亢進、不随意運動、振戦などがある（Scriver and Kaufman 2001, Waisbren 2007）。Bartus らは（Bartus 2018）、過去の研究から、PKU

の若者では、Phe 値の上昇により、IQ 低下、実行機能障害、処理速度低下、作業記憶障害、反応時間遅延、注意欠陥、及びその他の心理的障害をきたすと報告した。妊娠した未治療の PKU 女性では、流産又は胎児発育障害（子宮内発育遅延）及び先天異常リスクが高い（Caletti 2020）。

1.3 PKU の臨床管理

PKU の神経学的影響を考えると、正常な発達を確保するためには早期発見が重要である。ほとんどの国では、通常の新生児スクリーニングプログラムの一環として出生時に PKU の診断が行われる（Blau 2014）。PKU を有する出生児は、出生時には正常に見えることが多く、PKU と診断されたら直ちに Phe 制限調製乳を開始しなければならない。

PKU の生涯管理には、タンパク質消費を大幅に減らして食事からの Phe 摂取量を制限したり、特別に設計された Phe 除去医療食による補充がある（Macleod and Ney 2010, Blau and Longo 2015）。長期的に Phe 制限食を守るのは困難で、栄養不足及び心理社会的影響のリスクがあり、一般に最適な臨床転帰が得られない（MacDonald 2012, Ashe 2019）。

PKU を効果的に管理するには制限食では不十分なことが多く、一般的に患者の Phe 値は依然として上昇しており、薬物療法を管理に入れる必要がある（MacDonald 2012）。本邦では、合成型 BH_4（サプロプテリン）が PKU 患者の HPA に対し承認された 2 種類の治療薬の 1 つである。しかし、サプロプテリンが有効な患者の割合は低く（約 20%）、古典的 PKU 患者では、ほとんど又はまったく効果が認められない（Burnett 2007, Levy 2007）。効果的な治療及び症状管理の選択肢が限られていることから、広範な PKU 集団において、安全かつ Phe 血中濃度を低下させる新製剤に対する重要なアンメットメディカルニーズが依然として存在する。

1.4 Sepiapterin の作用機序

Sepiapterin は二重の作用機序を有し、薬理学的シャペロンとして作用し、バリアント PAH 分子の適切な立体配置を促進するだけでなく（Gersting 2023）、BH_4 合成の基質として機能することにより、PAH の必須の補因子であり薬理学的シャペロンでもある BH_4 の細胞内濃度を上昇させる（Ohashi 2011, Werner 2011）。経口投与された sepiapterin は、極めて効率的に細胞内に輸送され、プテリンサルベージ経路を介して BH_4 に変換される。

Sepiapterin はこの二重の薬理学的シャペロンとしての役割により、PKU でよく認められかつ BH_4 に対する感受性が低いことが知られている PAH バリアントを含む欠損 PAH 酵素に対し（Gersting 2023）、酵素活性を増強させ、結果として血中 Phe 値の低下をもたらす。

1.5 Sepiapterin の非臨床開発プログラム

ICH ガイドラインに従い、sepiapterin の完全な非臨床開発プログラムを実施した。

Sepiapterin の作用機序を明らかにするために、PAH タンパク質バリアントを安定化させ、PAH 活性を増加させる sepiapterin の作用を評価する in vitro 試験及び *Pah-R261Q* PKU マウスモデルを用いた in vivo 試験をはじめとする効力を裏付ける試験を実施した。Sepiapterin の副次的薬力学的（PD）特性は、in vitro のオフターゲットアッセイによって評価した。完了した安全性薬理試験には（ICH

2000, ICH 2005）、sepiapterin 及び BH_4 の心血管機能に対する影響を評価する in vitro ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子（hERG）試験、並びに心血管系、中枢神経系及び呼吸系の in vivo 安全性薬理評価などが含まれる（以下に記載した GLP 毒性試験の一部として実施）。

Sepiapterin を経口投与したときの吸収、分布、代謝、排泄及び PK 薬物相互作用の傾向を検討するため、広範な薬物動態（PK）試験を実施した。C57BL/6、CD-1 及び CByB6F1 Tg(HRAS)2Jic マウス、Sprague Dawley 及び Long-Evans ラット、ニュージーランド白色ウサギ、ビーグル犬、カニクイザル及びマーモセットを用いて、sepiapterin の吸収及び／又は分布を評価する単回投与及び反復投与試験を実施した。Sepiapterin の代謝は、ヒト腸内細菌叢及び組織 S9 画分を用いて in vitro で、並びにラット及びサルに[^{14}C]-sepiapterin を単回経口投与して評価した。Sepiapterin の排泄は、C57BL/6 マウス、Sprague Dawley ラット及びカニクイザルを用いた単回投与試験で評価した。

Sepiapterin によるチトクローム P450（CYP450）アイソザイムの誘導能、及びヒト CYP450 アイソザイム活性に対する阻害能は、プールしたヒト肝ミクロソーム又は凍結保存ヒト肝細胞を用いて in vitro で評価した。トランスポーターを介した薬物相互作用試験を in vitro で実施し、sepiapterin 及び BH_4 がヒトでの排出及び取り込みトランスポーターの阻害剤及び基質となり得るか検討した。

ラット及びマーモセットは薬物動態及び代謝プロファイルがヒトと類似していることから、毒性試験の主要動物種として選択した。マーモセットにおける PK データから、ヒトと同様に、sepiapterin の BH_4 への代謝は速やかで広範であることが示されている。経口投与後の sepiapterin の血漿中濃度は定量下限（LLOQ）に近く、まれにしか測定可能な濃度が認められなかった。ラットでも、sepiapterin が BH_4 に速やかに変換されることが示されており、sepiapterin 濃度は速やかに LLOQ 未満に低下した。遺伝子配列及び酵素活性が動物種間で評価されており、sepiapterin 還元酵素（SR：sepiapterin を BH_4 に変換する主要酵素）の遺伝子は、ラットとヒトで 74%の配列相同性があった（Wu 2020）。PAH の遺伝子は、ラットとヒトで 96%という高い配列類似性があり（Flydal 2019）、ヒトとラットの PAH ではいくらかの構造的違いがあるものの、PAH 単量体の構造は類似している。

Sepiapterin の包括的毒性プログラムは ICH ガイドラインに従って実施し、in vivo 試験は、特に指定がない限りすべて GLP 規制に準拠して実施した。Sepiapterin の予定臨床投与経路は経口であるため、非臨床試験は経口投与経路を用いて実施した。Sepiapterin は長期的に投与される薬剤であるため、非臨床安全性評価は長期間にわたる反復投与に対応するようデザインした。Sepiapterin の連続経口投与による安全性評価は、以下の各試験で実施した。野生型 CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウスに 28 日間、CD ラット（非 GLP）、Sprague Dawley ラット及びマーモセットに 14 日間連日、Sprague Dawley ラット及びマーモセットに 13 週間連続、Sprague Dawley ラットに 26 週間連続、及びマーモセットに 9 ヵ月間（39 週間）連続で経口投与した。GLP 適合試験には、トキシコキネティクス（TK）評価も含まれた（ICH 1994, ICH 1998）。

Sepiapterin の生殖発生毒性試験として、ICH ガイダンスに準拠して、ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（FEED）、妊娠ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験、並びにラットを用いた出生前及び出生後の発生試験を実施した（ICH 2020a, ICH 2020b）。

さらに、最初の薬物動態試験で生後（PND）4 日～PND9 の新生児ラット、及びその後毒性試験で PND4～PND70 の幼若ラットを用いて sepiapterin の影響を検討した。

Sepiapterin の遺伝毒性の有無を検討するために、ICH ガイダンス M3(R2)及び S2(R1)に従って、in vitro で細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類細胞を用いる染色体異常試験、in vivo でラット小核・コメット試験を実施した（ICH 2009, ICH 2012）。Sepiapterin のがん原性について証拠の重み付け（WOE）評価をモジュール 2.6.6 に示す。トランスジェニックマウスを用いて 26 週間がん原性試験を実施した。

不純物の変異原性を分類するために、sepiapterin の原薬（DS）と製剤（DP）について定量的構造活性相関［(Q)SAR］評価を実施し、不純物の安全性を 2 つのラット 28 日間試験で確認した（ICH 2006a, ICH 2006b, ICH 2023）。Sepiapterin の潜在的な依存傾向を評価するため、WOE 評価を実施した。BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いて in vitro 光毒性試験を実施し、光毒性の有無を検討した。

臨床試験の実施を支持することを目的とした主要な毒性試験及び安全性薬理試験は、米国（US）FDA の GLP 規則（21 CFR Part 58）又は経済協力開発機構（OECD）の GLP 原則［C(97)186/Final］に従って、OECD のデータ相互受け入れ（MAD）プログラム加盟国の一つで実施された。探索的試験は、試験実施施設の標準操作手順書を遵守して実施した。

まとめると、非臨床試験データから、申請する適応症における sepiapterin の使用を支持する良好な薬理学的及び PK 特性並びに安全性プロファイルが明らかになった。

2. 薬理試験

非臨床薬理試験の詳細な結果は、モジュール 2.6.2 並びにモジュール 4 の各試験報告に示す。

効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験で構成される sepiapterin の包括的な非臨床薬理プログラムが完了している。このプログラムにより、sepiapterin の作用機序が証明され、PKU 治療における sepiapterin の使用が支持される。

2.1 効力を裏付ける試験

Sepiapterin の作用機序は、薬理試験及び PK 試験、並びに公表文献によって裏付けられている（モジュール 2.6.2、2 項）。

In vitro で実施した効力を裏付ける試験（PTC923-2023-099 試験、（Gersting 2023））から、sepiapterin は薬理学的シャペロンとして作用し、変異型 PAH タンパク質の活性を高めることが示された。種々の PAH タンパク質バリアントを発現する COS-7 細胞を、0、5 又は 20 µM の sepiapterin で処理し、PAH 活性を評価した。よく見られる PKU 遺伝子型 15 種類のうち 10 種類の遺伝子型が sepiapterin 処理によって PAH 活性が増強した。その中には、IVS10-11 G>A など、BH_4 に感受性のないことが知られている変異型 PAH 対立遺伝子（アレル）が含まれていた（Trunzo 2015）。さらに、熱ストレス条件下で実施した示差走査蛍光測定により、sepiapterin は変異型 PAH タンパク質の

安定性を向上させることが示された。総合すると、以上のデータから、PAH 機能に対する保護作用を有する sepiapterin のシャペロン活性が明らかになった。

Sepiapterin は BH_4 生合成の天然の前駆体であり、経口投与後は速やかに BH_4 に変換され（Sawabe 2002, Sawabe 2004, Sawabe 2008, Werner 2011, Smith 2019）、PTC 社で評価したすべての動物種（マウス、ラット、ウサギ、マーモセット、カニクイザル及びイヌ）で BH_4 の血漿中濃度を著しく上昇させることが明らかになっている（モジュール 2.6.4、3 項）。BH_4 は Phe の代謝に不可欠で（Werner 2011）、PKU で認められるタンパク質分解を受けやすい変異型 PAH タンパク質のミスフォールディング及び不活化を防止する薬理学的シャペロンとして作用する（Pey 2004, Thony 2004）。したがって、sepiapterin は PAH の安定化において二重のシャペロン作用を有する。すなわち、sepiapterin 未変化体のシャペロン活性に加えて、細胞内で sepiapterin から生成される BH_4 によるシャペロン活性も有する（Gersting 2023）。

複数の試験から、外因性に添加した BH_4 と比較して、sepiapterin はより効率的に細胞内に輸送されることが示されている。BH_4 は主に、非効率的なプッシュ・プル・2 ステッププロセスを介して細胞内に取り込まれる（まず、BH_4 が酸化されて、より透過性の高い 7,8-ジヒドロビオプテリン［BH_2］となり、次いで細胞が BH_2 を取り込み、サルベージ経路を介して酵素的に活性な BH_4 に還元される）。一方、sepiapterin は容易かつ迅速に細胞内に取り込まれる（Hasegawa 2005, Sawabe 2005, Sawabe 2008）。BH_4 は P-糖タンパク（P-gp、別名：多剤耐性タンパク質 1［MDR1］）の基質であると考えられることから（PTC923-2021-012 試験）、この排出トランスポーターにより、BH_4 の細胞への直接取り込みが阻害される可能性がある（Yamamoto 1996, Hasegawa 2002）。一方、sepiapterin は P-gp の基質ではないことが PTC 試験で示されている（PTC923-2020-002 試験）。

したがって、培養細胞を様々な濃度（最高 200 µM）の sepiapterin で処理した in vitro 試験（Hasegawa 2005, Sawabe 2008）及びマウスに 10 mg/kg で sepiapterin を投与した in vivo 試験（Sawabe 2002, Sawabe 2004）で示されたように、外因性に添加した sepiapterin は、外因性に添加した BH_4 よりも細胞内 BH_4 濃度を効率よく上昇させる。In vitro では、sepiapterin は BH_4 よりも細胞内 BH_4 濃度を約 10 倍速く上昇させ、その結果、BH_4 濃度は約 20 倍～30 倍高くなる（Yamamoto 1996, Hasegawa 2005, Sawabe 2008）。マウスの薬物動態試験では、sepiapterin を単回経口投与したときの BH_4 濃度は、BH_4 を同様の用量で投与したときよりも高いことが示された。この結果は、sepiapterin の方がより効率的に組織内に輸送されることと一致していた（16H0208S-X01/6016-2880 試験）。Sepiapterin の投与により BH_4 濃度が上昇すると、PAH 酵素の活性が亢進し、Phe がチロシンに変換されて、血中 Phe 濃度が低下する。

PKU のマウスモデルにおいて、経口投与した sepiapterin による血中 Phe 濃度の低下が示されている（モジュール 2.6.2、2.2.1 項）。*Pah-R261Q* は PAH 遺伝子のうち最も高頻度に認められるヒト変異の 1 つで、*Pah-R261Q* ホモ接合体 PKU マウスモデル（Aubi 2021）では、sepiapterin の経口投与により、Phe 負荷後の血中 Phe 濃度が低下した（PTC923-2024-114 試験）。Phe 負荷後の保護作用の向上と一致して、sepiapterin 投与マウスの肝臓における PAH 酵素活性の ex vivo 分析では、PAH 活性の増強が認められた。PTC 試験で評価した又は公表文献で報告されているその他の様々な動物モデ

ルにおいても、sepiapterin の in vivo 生物学的活性が示され、この活性は、BH_4 濃度の増加及び BH_4 依存性酵素の活性の正常化と一致していた（モジュール 2.6.2、2.2.2 項）。

まとめると、効力を裏付ける試験によって、sepiapterin の相互に関連するいくつかの作用機序が裏付けられた。これらの作用機序はいずれも PAH 酵素活性を亢進させる。また、sepiapterin は in vivo で生物学的活性を発揮することが示された。

2.2 副次的薬理試験

94 種類の特有のオフターゲットアッセイを用いて、in vitro で sepiapterin とのオフターゲット相互作用の潜在的リスクを評価した（モジュール 2.6.2、3 項）。この評価により、sepiapterin が臨床的に意味のあるオフターゲット相互作用を有する可能性は低いことが示された（PTC923-2021-003 試験）。

2.3 安全性薬理試験

ICH S7A 及び S7B に従った（ICH 2000, ICH 2005）安全性薬理試験が実施されている（モジュール 2.6.2、4 項）。

呼吸系

Sprague Dawley ラットを用いた in vivo 試験において sepiapterin は、1000 mg/kg/日までの用量で呼吸系パラメータ（呼吸数、一回換気量、分時換気量）に悪影響を及ぼさなかった（CNSA-TOX-001-2017 試験、CNSA-TOX-001-2018 試験）。

中枢神経系

Sprague Dawley ラットを用いた in vivo 試験において sepiapterin は、1,000 mg/kg/日までの用量で機能観察総合評価法（FOB、オープンフィールド、操作試験、生理学的及び神経筋機能の評価）で評価したところ、CNS に悪影響を及ぼさないことが示された（CNSA-TOX-001-2017 試験、CNSA-TOX-001-2018 試験）。

心血管系

心血管系に対する安全性薬理を in vitro 及び in vivo 試験で評価した。

ヒト胎児腎臓由来 293（HEK293）細胞を用いて hERG 急速活性型遅延整流カリウム電流（IK_r）に及ぼす sepiapterin（CNSA-PHARM-001-2017 試験）及び代謝物 BH_4（PTC923-2023-056 試験）の影響を in vitro で評価した。Sepiapterin は、検討した最高濃度 30 µM（＝約 7,000 ng/mL、最高目標治療用量 60 mg/kg/日投与時の sepiapterin の平均 C_{max} 2.8 ng/mL の 2,500 倍に相当）では明らかな作用を示さなかった。BH_4 は、866 µM（＝272 µg/mL、最高目標治療用量 60 mg/kg/日投与時の BH_4 の平均 C_{max} 343 ng/mL の 793 倍に相当）で hERG テール電流を阻害しなかった。

In vivo 試験では、1,000 mg/kg/日までのすべての用量群の雌雄マーモセットにおいて、sepiapterin に関連した心血管系への影響は認められなかった（CNSA-TOX-002-2017 試験、CNSA-TOX-002-2018 試験、PTC923-2020-004 試験）。

まとめると、安全性薬理試験では、sepiapterin に関連した影響は認められなかった。

3. 動物での薬物動態及び薬物代謝

PK プログラムは、薬理学的用量及び毒性学的用量において in vivo における sepiapterin の体内動態を明らかにする目的でデザインされた。非臨床薬理試験の詳細な結果は、モジュール 2.6.4 並びにモジュール 4 の各試験報告に示す。

C57BL/6、CD-1 及び CByB6F1 Tg(HRAS)2Jic マウス、Sprague Dawley 及び Long-Evans ラット、ニュージーランド白色ウサギ、ビーグル犬、カニクイザル及びマーモセットを用いて、spiapterin の非臨床 PK/TK 評価を実施した。検討したすべての動物種において、sepiapterin は速やかに吸収された後、速やかにほとんどが BH_4 に変換され、全身循環血中の BH_4 を有意かつ速やかに増加させた。Sepiapterin 及び BH_4 はいずれも全身循環から速やかに消失した。

まとめると、実験動物において、小児及び成人 PKU 患者の HPA 治療薬としての sepiapterin の臨床使用を妨げるような sepiapterin 及び BH_4 の PK 特性及び代謝動態特性は認められない。

3.1 吸収

非臨床試験に用いた動物種（マウス、ラット、ウサギ、イヌ、マーモセット及びカニクイザル）に sepiapterin を経口投与したときは、一般に投与後 1～2 時間で sepiapterin の最高血漿中濃度に達した。その後、ほとんどの動物種（イヌ及びウサギを除くすべて）で、循環血中の sepiapterin は速やかに定量限界未満（BQL、LLOQ 未満）に減少した（モジュール 2.6.4、3 項）。

ベースライン時の内因性 sepiapterin 濃度は概ね BQL であったのに対し、ベースライン時の内因性 BH_4 濃度は概ね測定可能であったが低値であった。Sepiapterin を経口投与後は、血漿中 BH_4 濃度は速やかに上昇し（T_{max} は投与後約 2～4 時間）、概ね投与後 24 時間以内に消失した。終末相 $T_{1/2}$ は、推定できる場合では概ね 6 時間未満であった（モジュール 2.6.4、3 項）。

内因性 BH_4 はマウスで 34～73 ng/mL の範囲であった。野生型 CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウスに sepiapterin を反復投与したとき、sepiapterin の C_{max} は投与 1～3 時間後に認められ、血漿中濃度は概ね 24 時間前に BQL まで低下した。経口投与後、sepiapterin は速やかに吸収され、BH_4 に変換された。Sepiapterin の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ 値は BH_4 値の 6%であった。BH_4 の C_{max} は概ね投与 3 時間後に認められた。Sepiapterin への曝露は雄よりも雌で高い傾向があったが、BH_4 の曝露量に性差はなかった。30 mg/kg/day 以上の用量では、BH_4 の C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ の増加は用量比を下回り、300 mg/kg/day 以上の用量では BH_4 の曝露量の増加は本質的にほとんどなかった。Sepiapterin を 1 日 1 回反復経口投与したとき、4,000 mg/kg/日の用量まで、マウスにおいて BH_4 の蓄積はほとんどみられなかった。

ラット（26 週間、PTC923-2020-003 試験）及びマーモセット（9 ヵ月間、PTC923-2020-004 試験）の長期投与試験では、BH_4 の連日反復投与による明らかな蓄積は認められなかった。ラット及びマーモセットにおいて、BH_4 の曝露量は、30 mg/kg～100 mg/kg までほぼ用量に比例して増加した。100 mg/kg を超える用量では、曝露量の増加は用量比例性を下回った。BH_4 の曝露量に明らかな性差の傾向は認められなかった。

PND4～PND9 の新生児ラットに sepiapterin を 1 日 1 回投与した試験において（PTC923-2020-006 試験）、PND4 及び PND9 の内因性 BH_4 が成熟ラット（CNSA-TOX-001-2018 試験）に比べて高値を示した。外因性に投与した sepiapterin の PK プロファイルを PND4 及び PND9 で検討したところ、成熟ラットと同様に、sepiapterin はほとんどが BH_4 に変換された。投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24h}$）の sepiapterin／BH_4 比は 5%未満であった。投与前の BH_4 濃度は PND4 から PND9 まで上昇し、新生児における BH_4 の蓄積が示唆された。ただし、sepiapterin を反復投与したときは、ベースライン値で補正した BH_4 の全身曝露量（C_{max} 値と $AUC_{0\text{-}24h}$ 値）に明らかな変化が認められなかったことから、BH_4 のクリアランスの上昇も確認された。PND9 における BH_4 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は、成熟ラットに体重換算で同じ用量の 30 及び 100 mg/kg を 91 日間反復投与したときのそれぞれ約 5 倍及び約 9 倍であった。

非臨床試験の動物種（ラット、イヌ、サル）で、プロトタイプの第 3 相試験用製剤をはじめとして sepiapterin の開発に使用された様々な製剤の相対的経口バイオアベイラビリティを検討した。製剤間で BH_4 の曝露量に有意差は認められなかった（モジュール 2.6.4、3.1.4 項、3.1.5 項及び 3.1.6 項）。

3.2 分布

Sepiapterin の分布は in vitro 及び in vivo 試験で評価した（モジュール 2.6.4、4 項）。

In vitro では、sepiapterin（PTC923-2021-013 試験）及び BH_4（PTC923-2022-030 試験）ともに、ヒト血漿タンパク結合率は低かった。Sepiapterin の結合は、0.1、1.0 及び 10 µM の濃度で評価した。結合率の幾何平均値は 15.4%であった。BH_4 のヒト血漿タンパク結合率は、2 µM で 41.3%、5 µM で 33.0%、15 µM で 24.1%であった。このことから、血漿タンパクへの結合は sepiapterin と BH_4 のいずれも低く、血漿中の sepiapterin と BH_4 の大部分はフリー体として存在することが確認された。安定化試薬が血漿タンパク結合に及ぼす影響は完全にはわかっていないため、数値の解釈には注意が必要であり、他の生理学的値を導き出すために使用してはならない。

マウス及びラットを用いた sepiapterin 及び BH_4 の in vivo 分布試験では、全身に広く分布することが示された。

マウス（16H0208S-X01/6016-2880 試験、PTC923-2023-046 試験）では、検出可能な濃度の内因性 BH_4 が存在していた。ベースラインの内因性 BH_4 濃度は、脳と血漿で同程度であったが、腎臓及び肝臓では、ベースラインの BH_4 濃度がはるかに高かった。Sepiapterin の単回経口投与後は、肝臓及び腎臓中の未変化体濃度は低値で、速やかに消失した。肝臓及び腎臓中の BH_4 曝露量は未変化体よりも高かったことから、未変化体は速やかに吸収され、末梢組織に分布し、BH_4 に変換されることが示唆された。増加した BH_4 は、血漿、腎臓及び肝臓から速やかに消失した。Sepiapterin の経口投与により、BH_4 は肝臓や腎臓などの組織に広く分布したが、脳内 BH_4 のバイオアベイラビリティは肝臓及び腎臓よりもはるかに低かった。

Long-Evans ラット（PTC923-2022-032 試験）に[^{14}C]-sepiapterin を単回経口投与したときは、[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能は全身に広く分布し、ほとんどの組織で投与後 4～8 時間で最高濃度に達し

た。全体として、[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能はラットの組織から着実に排泄された。内分泌系及び代謝／排泄系の組織、また消化管（GI）の組織に[^{14}C]-sepiapterin 由来の放射能が最も多く分布していた。投与後 48 時間後までにすべての CNS 組織で BQL となった。髄膜やぶどう膜などの特定のメラニン含有組織への放射能の分布は少なく、また長時間の滞留がなかったことから、[^{14}C]-sepiapterin 由来の放射能がメラニン含有組織中のメラニンと関連している可能性は極めて低い。同様に、有色皮膚中の濃度は白色皮膚と同程度であり、いずれの皮膚も投与後 72 時間では、BQL となった。

3.3 代謝

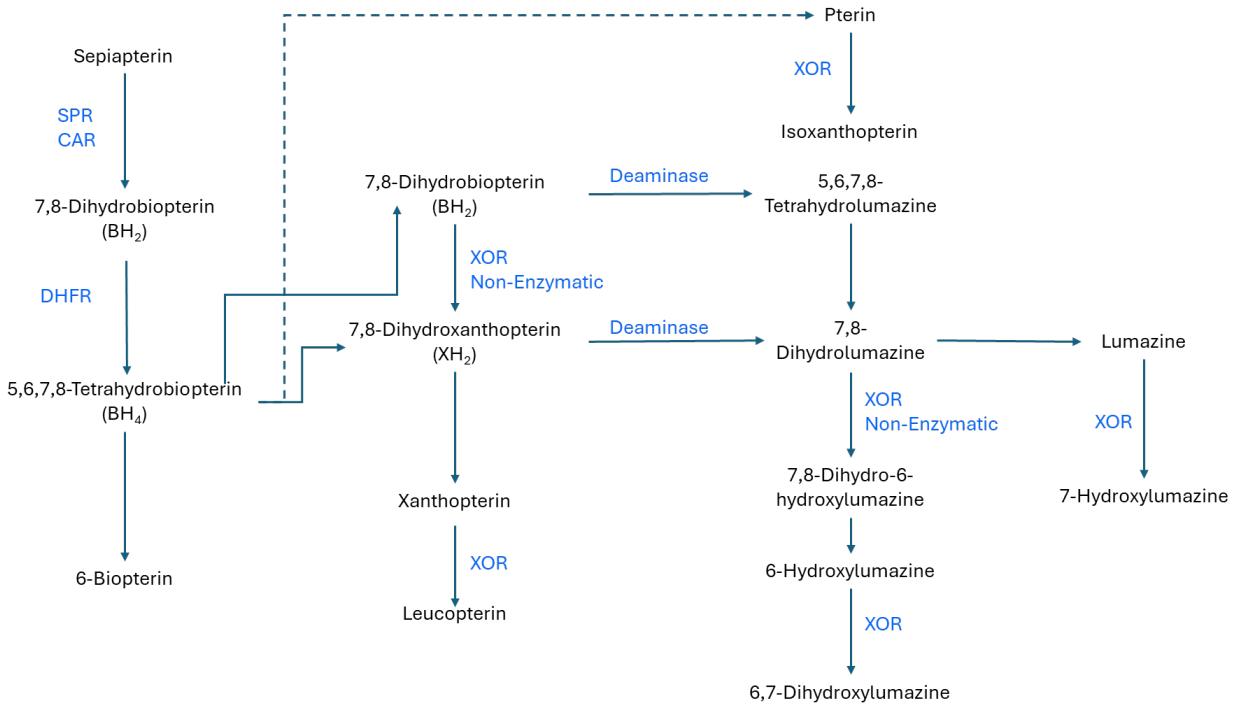
代謝試験から、代謝プロファイルは動物種間で質的に類似していることが示された。

内因性 sepiapterin の BH_4 への代謝は、プテリンサルベージ経路内で一方向の 2 段階還元である（Figure 1）。第 1 段階では主として SR、並びにカルボニル還元酵素（CR）によって、第 2 段階ではジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）によって代謝される（Werner 2011, Smith 2019）（モジュール 2.6.4、5.1 項）。

外因性の Sepiapterin に由来する BH_4 は、内因性 BH_4 と同様に、芳香族アミノ酸の触媒的水酸化の際に酸化されると考えられている。PAH、チロシン水酸化酵素（TH）、トリプトファンヒドロキシラーゼ（TPH）、アルキルグリセロールモノオキシゲナーゼ（AGMO）及び一酸化窒素合成酵素（NOS）の補酵素として作用する場合には、BH_4 は酸化される。4α-ヒドロキシ-テトラヒドロビオプテリンのようにこの過程で生成された代謝物の一部は、プテリン-4α-カルビノールアミン脱水素酵素（PCD）及びジヒドロプテリジンレダクターゼ（DHFR）により BH_4 を再生するためにリサイクルされる可能性がある（Figure 1）（Werner 2011）。

BH_2、キサントプテリン、イソキサントプテリン、7、8-ジヒドロキサントプテリン（XH_2）、ルマジン類及びその他のプテリジン誘導体などのさらなる代謝物も報告されている（Nichol 1985, Sawabe 2008, Rasmussen 2022）。余剰の BH_4 は主に尿中に排泄される（Ohashi 2011）。

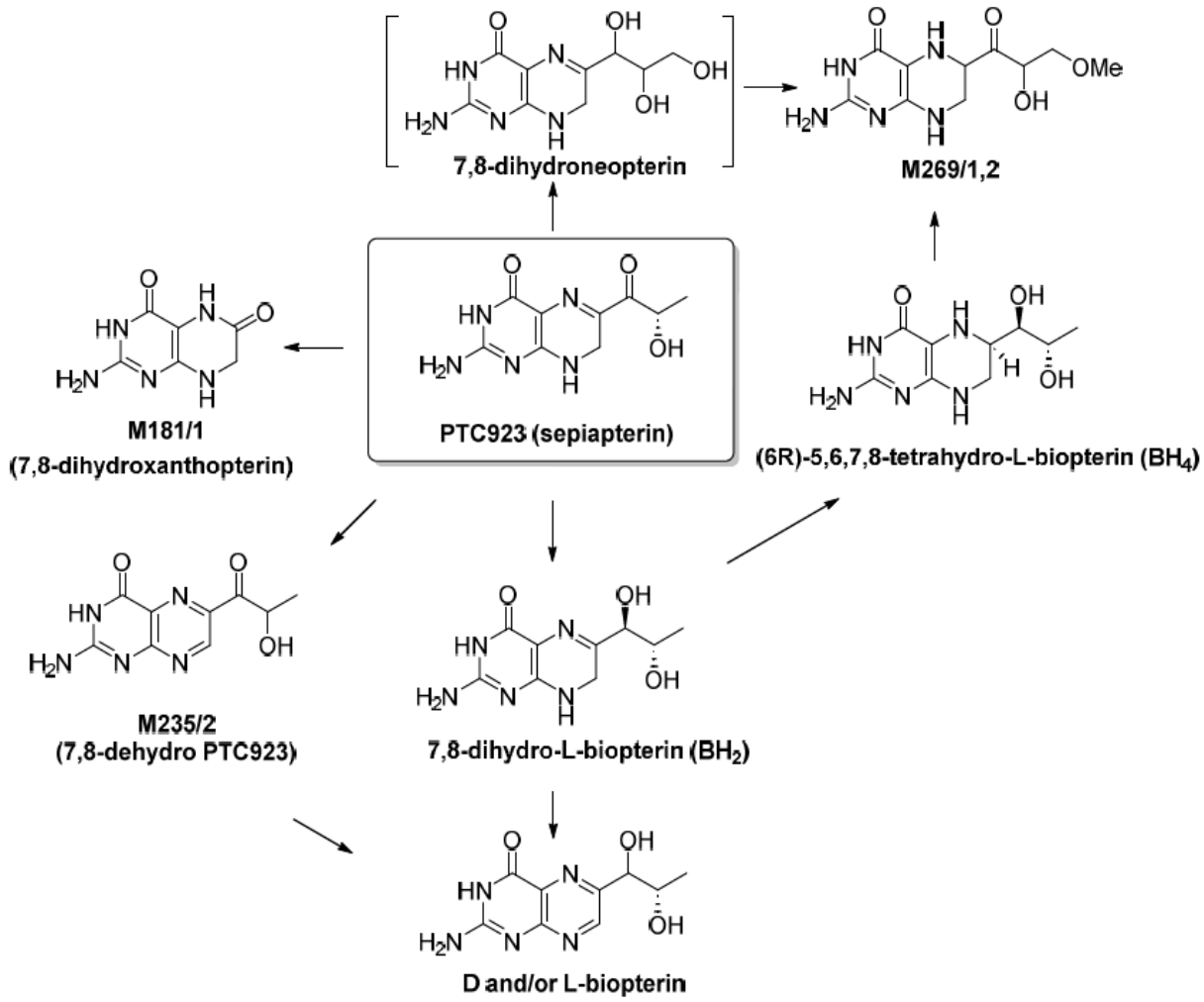
Figure 1. Sepiapterin の推定主要代謝経路



略語：CAR＝カルボニル還元酵素、DHFR＝ジヒドロ葉酸還元酵素、SPR＝sepiapterin 還元酵素、XOR＝キサンチン酸化還元酵素
出典：（Rasmussen 2022）より改変して引用、図 3

動物及びヒトの肝臓と腎臓の S9 画分を用いた in vitro 試験（PTC923-2023-081 試験）では、同様の代謝経路及び代謝物である BH_4、BH_2、D-/L-ビオプテリン、XH_2、M269/1、M269/2、M235/2 が認められた（Figure 2）。

Figure 2. ラット、ミニブタ、サル及びヒトの肝臓及び腎臓の S9 画分における sepiapterin の推定主要代謝経路



注：7, 8-ジヒドロキサントプテリン（7,8-dihydroxanthopterin）（M181/1）は代謝物 XH_2 である。

酵素 SR、DHFR 及び PCD は、様々な組織に広く発現している（proteinatlas.org）。ラットでは、DHPR mRNA は、脳幹、小脳、肝臓、腎臓、副腎及び腸管に最も多く分布し、これらの臓器の組織中には DHPR の酵素活性も認められている（Hoshiga 1993）。したがって、sepiapterin の代謝は様々な組織で起こるが、酵素 DHPR の分布及び活性が最も高い臓器は、肝臓、腎臓、腸、副腎及び脳である。

[^{14}C]-sepiapterin をラット及びサルに経口投与したときは、血漿、尿及び糞中で広範な代謝が認められた（モジュール 2.6.4、5.2 項）。これらの代謝経路は、酸化／脱水素化、還元／水素化、酸化的脱アミノ化、脱水、側鎖切断、メチル化などが単独又は複合的に関与していた。主要代謝経路は、ラット、サル及びヒトでほぼ同様であった。サル及びヒトへの[^{14}C]-sepiapterin の経口投与後 24 時間では、血漿中放射能の抽出率が低かったことで示されたように、内因性物質としての sepiapterin 及びその代謝物は他の生体分子の生合成にも関与していると考えられる。サルではマスバランスでの回収率が低く（42.75%）、7 日間のウォッシュアウト期間後の屍体における[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の残存率も低かった（0.83%）ことから（3.4 項参照）、揮発性代謝物の生成

が示唆された。このことは、[^{14}C]-sepiapterin をヒト腸内細菌叢とインキュベートした in vitro 試験でも示された（モジュール 2.7.2、2.1.5.2 項）。

ラットでは（PTC923-2022-035 試験）、循環血漿中の放射能に占める未変化体の割合は小さく、総放射能（TRA）の投与後 0 時間から最終定量可能時点又は最終検体採取時点までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-last}}$）の 0.91%を占めた。ラット循環血漿中に最も多く存在する代謝物は、M269/1 及び M269/2（おそらく BH_4 付加体/アーチファクト）で、血漿中 TRA $AUC_{0\text{-t}}$ の 39.4%を占める。胆管カニューレ挿入（BDC）ラットでは、投与量の 0.55%が胆汁中に排泄された。プールした胆汁中の未変化体の割合は 0.06%未満であった。最も多く認められた代謝物は M221/1（2'-デオキシ体）で、投与量の 0.13%を占めた。これよりも量の少ない代謝物で、共溶出する M181/1（7, 8-ジヒドロキサントプテリン）、イソキサントプテリン及び M257/1 は、合わせると投与量の 0.07%を占めた。蓄尿中では未変化体は主要成分ではなく、無処置及び BDC ラットでともに投与量の 0.3%未満しか占めなかった。一方、BH_4 は無処置ラットで最も多い代謝物で、投与量の 2.93%を占めた。プールした糞中では、無処置及び BDC ラットのいずれにおいても、M221/1（2'-デオキシ体）が最も多い代謝物であった。

サルの血漿中では（PTC923-2022-036 試験）、未変化体は主要成分ではなく、投与後 0 時間～48 時間までの TRA の濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-48h}}$）の 0.27%を占めた。循環血漿中の主要代謝物は M381/1 で、血漿中 TRA $AUC_{0\text{-48h}}$ の 16.1%を占めた。尿中未変化体は少量の放射性成分であった。尿中の主要代謝物は M282/1 及び M181/1（7,8-ジヒドキサントプテリン）の 2 種類であり、それぞれ投与量の 1.50%及び 1.01%を占めた。糞中で最も多く認められた放射性成分は、未変化体、M221/1（2'-デオキシ体）及び M222/1 であった。

3.4 排泄

Sepiapterin の排泄を単回投与試験で評価したところ（モジュール 2.6.4、6 項）、sepiapterin の投与量の大部分が糞中に排泄された。

Sprague Dawley ラット（PTC923-2022-031 試験）及びカニクイザル（PTC923-2022-033 試験）に[^{14}C]-sepiapterin を経口投与したときは、尿中から回収されたのは TRA のうちのわずかな部分で（ラットで 9.21%、サルで 7.1%）、投与量の大部分は投与後 168 時間までに糞中に回収された（ラットで 84.7%、サルで 31.1%）。BDC ラットで胆汁を介する排泄量はわずか（0.57%）であった。サルにおける総回収率は低かったが（42.8%）、投与後 168 時間での屍体中に残存する TRA の割合は極めて小さく（0.83%）、投与量の大部分が既に体内から排泄されていたことが示された。

3.5 薬物動態学的薬物相互作用

Sepiapterin の CYP450 アイソザイムに対する誘導能及び阻害能を評価するために、in vitro CYP 介在性薬物相互作用試験を実施した（モジュール 2.6.4、7.1 項）。Sepiapterin は 50 μM までの濃度で、CYP450 アイソザイム 1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4 を阻害しなかった（CNSA-ADME-002-2017 試験）。また、10 μM までの濃度で、CYP450 アイソザイム 1A2、2B6 及び 3A4 を誘導しなかった（CNSA-ADME-001-2017 試験）。

トランスポーターを介する in vitro 薬物相互作用試験を実施し、ヒトでの排出トランスポーター［MDR1、乳癌耐性タンパク質（BCRP）及び胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP）］及び取り込みトランスポーター［平衡型ヌクレオシドトランスポーター（ENT）1、ENT2、多剤排出輸送体（MATE）1、MATE2-K、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3、有機アニオントランスポーターポリペプチド（OATP）1B1、OATP1B3、有機カチオントランスポーター（OCT1）及び OCT2］の阻害剤及び基質としての sepiapterin を評価した（モジュール 2.6.4、7.2 項）。Sepiapterin は BCRP の基質であるが、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OCT2 又は ENT1 の基質となる可能性は低い。ENT2 による sepiapterin の取り込みは、検討した最高濃度（3000 µM）で認められ、100 µM までは取り込みはみられなかった。この濃度は、治療用量の 60 mg/kg における sepiapterin の C_{max}（sepiapterin の C_{max} が 2.82 ng/mL、11.9 nM に相当）の 8,400 倍であり、臨床濃度には到達しなかった。したがって、sepiapterin は ENT2 の基質ではないと考えられる。Sepiapterin は、BCRP の弱い阻害剤であり（50%阻害濃度［IC_{50}］647.7 µM）、高濃度（3 mM）では ENT1、ENT2 及び OATP1B1 の弱い阻害剤である（PTC923-2020-002 試験、PTC923-2021-013 試験）。ヒト排出トランスポーター及びヒト取り込みトランスポーターの阻害剤及び基質としての BH_4 を評価する in vitro 試験を実施した（モジュール 2.6.4、7.2 項）。BH_4 は MDR1 及び BCRP の基質であり、高濃度（150 µM）では MATE2 K の基質であった。BH_4 が取り込みトランスポーターMATE1、OAT1、OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、ENT1 又は ENT2 の基質である可能性は低い。安定化剤 0.1% DTT の存在下で、BH4 は OAT3 の基質ではない。BH_4 は BCRP（IC_{50} 778.4 µM）及び MDR1（IC_{50} 992.9 µM）の阻害剤であり、OCT1 及び OCT2 に対しては弱い阻害剤である（PTC923-2021-012 試験）。

4. 毒性試験

モジュール 2.6.6 及びモジュール 4 の試験報告に詳細を記載したように、マウス、ラット、ウサギ及びマーモセットを用いて、sepiapterin の毒性プロファイルを評価した。非臨床安全性評価に用いた毒性試験の一覧を、該当する場合はそれぞれの無毒性量（NOAEL）又は最大耐量と共に Table 1 に示す。

まとめると、sepiapterin の毒性プロファイルの包括的な特性評価により、非臨床データが、小児及び成人 PKU 患者の治療で予定されている最高臨床用量 60 mg/kg/日での使用を支持する安全性プロファイルを示していることが確認された。

Table 1. Sepiapterin の非臨床安全性評価における毒性試験及びそれぞれの NOAEL の一覧

試験の種類	濃度又は用量	NOAEL／最大耐量（mg/kg/日）	試験番号
単回投与毒性試験			
試験は実施しなかった。			
反復投与毒性試験			
げっ歯類			
野生型 CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウス 5 日間（A 期）及び 28 日間（B 期）強制経口投与試験、GLP 適用	A 期：0、30、100、300、1,000 mg/kg/日 B 期：0、300、1000、4,000 mg/kg/日	4,000	PTC923-2023-053
CD ラット 14 日間経口投与 MTD 毒性試験、非 GLP	0、30、60、120、240 mg/kg/日	240	16I0231S-X01
Sprague Dawley ラット 14 日間強制経口投与毒性試験及び 14 日間回復性試験、GLP 適用	0、100、300、1,000 mg/kg/日	1,000	CNSA-TOX-001-2017
Sprague Dawley ラット 13 週間強制経口投与毒性試験及び 28 日間回復性試験、GLP 適用	0、30、100、300 mg/kg/日	100	CNSA-TOX-001-2018
Sprague Dawley ラット 26 週間強制経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験、GLP 適用	0、30、100、200 mg/kg/日	30	PTC923-2020-003
非げっ歯類			
マーモセット 14 日間強制経口投与毒性試験及び 14 日間回復性試験、GLP 適用	0、100、300、1,000 mg/kg/日	1,000	CNSA-TOX-002-2017
マーモセット 13 週間強制経口投与毒性試験及び 28 日間回復性試験、GLP 適用	0、30、100、300 mg/kg/日	300	CNSA-TOX-002-2018
マーモセット 9 ヵ月間強制経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験、GLP 適用	0、30、100、300 mg/kg/日	300	PTC923-2020-004
遺伝毒性試験			
ネズミチフス菌を用いる in vitro 細菌復帰突然変異試験、GLP 適用	312.5、625、1,250、2,500、5,000 µg/プレート（±S9 代謝活性化系）	NA	CNSA-TOX-003-2017
培養ヒトリンパ球を用いる in vitro 染色体異常試験、GLP 適用	0.031、0.063、0.125、0.25、0.5、1 mM（S9 代謝活性化系なし） 0.031、0.063、0.125、0.25、0.5、0.75、1 mM（S9 代謝活性化系あり）	NA	CNSA-TOX-004-2017
Sprague Dawley ラットを用いた in vivo 試験 – 小核試験及びコメット試験、GLP 適用	0、100、300、1,000、2,000 mg/kg/日	2,000	CNSA-TOX-005-2017
がん原性試験			
CByB6F1 マウス 26 週間強制経口投与がん原性試験、GLP 適用	0、30（雄のみ）、100、300、1,000 （雌のみ）mg/kg/日	300（雄） 1,000（雌）	PTC923-2023-070
PMDA との合意に基づき（PMDA 対面助言 20[redacted] 年[redacted] 月[redacted] 日）、日本の新薬承認後にラット 2 年間がん原性試験を報告予定である。Sepiapterin のがん原性について証拠の重み付け（WOE）評価をモジュール 2.6.6、5.2 項に示す。			

試験の種類	濃度又は用量	NOAEL／最大耐量（mg/kg/日）	試験番号
生殖発生毒性試験			
Sprague Dawley ラットに強制経口投与したときの sepiapterin の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、GLP 適用	0、30、100、300 mg/kg/日	300	PTC923-2022-028
妊娠 Sprague Dawley ラットに強制経口投与したときの sepiapterin の胚・胎児発生に関する DRF 強制経口投与試試験、非 GLP	0、100、300、1,000 mg/kg/日	1,000	PTC923-2021-005
妊娠 Sprague Dawley ラットに強制経口投与したときの sepiapterin の胚・胎児発生試験、GLP 適用	0、100、300、1,000 mg/kg/日	1,000	PTC923-2021-023
妊娠 NZW ウサギに強制経口投与したときの sepiapterin の DRF 胚・胎児発生試験、非 GLP	0、100、300、1,000 mg/kg/日	1,000	PTC923-2021-006
妊娠 NZW ウサギに強制経口投与したときの sepiapterin の胚・胎児発生試験、GLP 適用	0、100、300、1,000 mg/kg/日	1,000	PTC923-2021-024
妊娠 Sprague Dawley ラットに強制経口投与したときの sepiapterin の出生前及び出生後の発生試験、GLP 適用	0、30、100、300 mg/kg/日	300	PTC923-2023-048
新生仔 Sprague Dawley ラット 6 日間強制経口投与 PK 試験、GLP 適用	0、10、30、100 mg/kg/日	100	PTC923-2020-006
幼若 Sprague Dawley ラット 10 週間強制経口投与毒性試験、GLP 適用	0、5、10、30 mg/kg/日（PND4～PND28）及び 0、30、100、300 mg/kg/日（PND29～PND70）	300	PTC923-2023-045
局所刺激性試験			
経口投与ではこの試験は必要としない。			
その他の毒性試験			
免疫毒性試験			
試験は不要と考えられた。			
薬物乱用性評価			
追加の乱用性試験は不要である（詳細はモジュール 2.6.6、8.2 項及びモジュール 2.6.6、Appendix 2 に示す）。			
代謝物試験			
追加試験は不要と判断された。			
不純物			
(Q)SAR リスク評価：DS、非 GLP	NA	NA	[redacted] 報告書
(Q)SAR リスク評価：DS、非 GLP	NA	NA	PTC923-2023-057
(Q)SAR リスク評価：DS、非 GLP	NA	NA	PTC923-2023-074
(Q)SAR リスク評価：DS、非 GLP	NA	NA	PTC923-2024-126
(Q)SAR リスク評価：DP、非 GLP	NA	NA	PTC923-2022-037
ネズミチフス菌及び大腸菌 CC-02 を用いる in vitro 細菌復帰突然変異試験、GLP 適用	最高 5,000 μg/プレート（DRF） 最高 1,000 μg/プレート（変異原性試験）	NA	PTC923-2021-025

試験の種類	濃度又は用量	NOAEL／最大耐量（mg/kg/日）	試験番号
ネズミチフス菌及び大腸菌 CC-14 を用いる in vitro 細菌復帰突然変異試験、GLP 適用	最高 5,000 µg/プレート（DRF） 最高 1,000 µg/プレート（変異原性試験）	NA	PTC923-2021-026
Sprague Dawley ラット 28 日間不純物の安全性確認試験、GLP 適用	DS：0、100 mg/kg/日 DP：0、100、300 mg/kg/日	100（DS） 300（DP）	PTC923-2021-007
Sprague Dawley ラット 28 日間不純物の安全性確認試験、GLP 適用	DS：0、100 mg/kg/日、エナンチオマー：5.6 mg/kg/日	100	PTC923-2023-044
光毒性試験			
BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた in vitro 光毒性評価、GLP 適用	1.78、3.16、5.62、10、17.8、31.6、56.2、111 µg/mL	NA	PTC923-2021-010

略語：DP＝製剤、DRF＝用量設定、DS＝原薬、MTD＝最大耐量、NA＝該当せず、NOAEL＝無毒性量、NZW、ニュージーランド白色、PK＝薬物動態、PMDA＝独立行政法人医薬品医療機器総合機構、PND＝生後日齢、(Q)SAR＝定量的構造活性相関、S9＝代謝活性化系、アロクロール 1254 誘導ラット肝ミクロソーム酵素

対照動物から採取したサンプルについて適切な分析が実施されている信頼できるすべての反復投与毒性試験において、sepiapterin 及びその代謝物 BH_4 の TK プロファイルを評価した。いずれの試験においても、sepiapterin の吸収は速やかで、sepiapterin は速やかに、ほとんどが BH_4 に変換された。全身循環中の sepiapterin の曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は、マウス及びラットでは概ね BQL であり、マーモセットでは BH_4 の曝露量 5%未満であった。イヌ及びウサギでは変換速度が遅く、sepiapterin 濃度はより高かった（妊娠雌ウサギにおける BH_4 値の最大 24%）。

トキシコキネティクス解析は概ねラットを用いた BH_4 に限定された。300 mg/kg/日から 1,000 mg/kg/日に用量を増量したときは BH_4 曝露量が非線形性の動態又は飽和が認められたことから、ラット 13 週間反復投与試験、マーモセット 13 週間及び慢性毒性反復投与試験、ラット雌雄受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、並びにラット出生前及び出生後の発生試験、並びにラット幼若動物毒性試験をはじめとしてほとんどの毒性試験では、最高用量として 300 mg/kg/日を選択した。評価したすべての動物種における BH_4 への曝露量は、潜在的な毒性について意味のある評価を行うのに十分であった。

4.1 反復投与毒性試験

Sepiapterin のほ乳類を用いる GLP 適合毒性試験は、ラット及びマーモセットで実施し完了した（モジュール 2.6.6、3 項）。投与期間は、ラットでは 200 mg/kg/日までの用量で 26 週間、マーモセットでは 300 mg/kg/日までの用量で 9 ヵ月間（39 週間）まで延長した。毒性学的に重要な所見は、ラット 13 週間及び 26 週間試験における腎毒性のみであった。

げっ歯類

ラット 14 日間試験（CNSA-TOX-001-2017 試験）では、最高 1,000 mg/kg/日までの用量で sepiapterin を投与し、その後 2 週間の回復期間を設けた。Sepiapterin は、最高用量 1,000 mg/kg/日まで忍容性が良好であり、試験中に行われたどの評価においても有害作用は認められなかった。NOAEL は 1000 mg/kg/日であった。

ラット 13 週間反復投与試験（CNSA-TOX-001-2018 試験）では、最高用量 300 mg/kg/日までの用量を投与し、その後 4 週間の回復期間を設けた。100 mg/kg/日及び 300 mg/kg/日を投与した動物では、GI 管の所見として胃、十二指腸、空腸、回腸及び／又は盲腸の内腔に柔らかい及び／又はクリーム状の物質が認められたが、対応する病理組織学的所見は認められなかった。GI 管の所見は 28 日間の回復期間終了までに完全に回復した。これらの所見は有害な作用ではないと判断された。腎臓の所見としては、300 mg/kg/日群で斑状／退色巣、結晶沈着を伴う又は伴わない尿細管変性、腎臓重量の増加並びに血清尿素及び血清クレアチニンの増加が認められた。4 週間の回復期間終了までに、尿細管変性は部分的に回復し、血清尿素濃度の増加も回復したが、腎臓重量の増加及び血清クレアチニンの上昇は持続していた。上記の変化は有害な作用だと判断された。300 mg/kg/日群の雌雄で認められた腎臓の有害所見（部分的に回復）に基づくと、NOAEL は 100 mg/kg/日であった。

ラット 26 週間試験（PTC923-2020-003 試験）では、最高 200 mg/kg/日の用量で sepiapterin を投与し、その後、4 週間の回復期間を設けた。100 及び 200 mg/kg/日で、腎臓に sepiapterin に関連した有

害所見が認められた。腎臓の有害な変化は、中等度～顕著な尿細管変性及び再生で、この所見は、細胞傷害及びその後の修復を示している（Frazier 2012）。また、腎臓の遠位乳頭集合管内の尿細管での結晶沈着、中等度の間質性炎症、並びに軽微～軽度の腎線維症も認められた。200 mg/kg/日群の腎臓で有害所見が認められた雄では、血清尿素及び血清クレアチニンの増加が認められた。結晶沈着は、軽微～軽度の尿細管上皮細胞過形成（単純性過形成）を伴っていた。病理担当者及びピアレビュー病理専門家は、結晶が存在しなくなった回復動物では、形態学的外観が正常で乳頭尿細管過形成病変が認められないことから、腎尿細管過形成（単純性過形成）は sepiapterin と関連があるが、前がん性ではないと結論した（PTC923-2020-003「病理専門家の報告書」）。

また、sepiapterin は 200 mg/kg/日群の雄で膀胱肥大を伴う膀胱結石形成を誘発し、それによって、尿路上皮の適応性変化（過形成及び扁平上皮化生）並びに尿流出路の部分的閉塞を引き起こすことによって、膀胱、尿管、及び腎盂の拡張をもたらし、結果として腎盂腎炎をきたした可能性がある（Cohen 2018）。

4 週間の回復期間後は、100 及び 200 mg/kg/日群の雄の及び 200 mg/kg/日群の雌の腎臓に、sepiapterin に関連した変化は認められず、完全に回復したことが示された。腎臓の有害所見として、中等度の尿細管変性、中等度の間質性炎症及び軽度の間質性線維症が 100 mg/kg/日群の雌 1 匹にのみに認められたが、これらの所見は部分的に可逆的に回復した。いずれの回復動物にも、結晶及び尿細管過形成は認められなかった。100 mg/kg/日以上の投与群の雌雄の腎臓で認められた有害所見に加え、30 mg/kg/day 群では所見が認められなかったことから、無影響量（NOEL）は 30 mg/kg/日であった。

非げっ歯類

マーモセット 14 日間試験（CNSA-TOX-002-2017 試験）では、最高 1,000 mg/kg/日の用量で投与し、その後 2 週間の回復期間を設けた。この試験では、sepiapterin に関連した有害な所見は認められず、NOAEL は 1,000 mg/kg/日であった。

マーモセット 13 週間試験（CNSA-TOX-002-2018 試験）では、最高 300 mg/kg/日の用量で sepiapterin を投与し、その後、4 週間の回復期間を設けた。この試験では、sepiapterin に関連した所見は認められず、NOAEL は 300 mg/kg/日であった。

マーモセット 9 カ月試験（PTC923-2020-004 試験）では、最高 300 mg/kg/日の用量で sepiapterin を投与し、その後、4 週間の回復期間を設けた。この試験では、sepiapterin に関連した所見は認められず、NOAEL は 300 mg/kg/日であった。

Sepiapterin の主要な毒性試験で認められた主な毒性所見の概要を、NOAEL で得られた代謝物 BH_4 の全身曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）と共に Table 2 に示す。

Table 2. 反復投与試験における主な毒性所見及び sepiapterin 経口投与による BH_4 の全身曝露量

動物種	**投与期間**	**NOAEL（mg/kg/日）**	**BH_4 の TK パラメータ（NOAEL）**	**標的臓器（用量）**	
ラット	14 日間（14 日間回復期間）	1,000	C_{max}： M：2,990 ng/mL F：3,630 ng/mL $AUC_{0\text{-}24h}$： M：28,900 h•ng/mL F：29,500 h•ng/mL	なし	
ラット	13 週間（28 日間回復期間）	100	C_{max}： M：1,400 ng/mL F：2,380 ng/mL $AUC_{0\text{-}24h}$： M：9,790 h•ng/mL F：9,340 h•ng/mL	**腎臓（300 mg/kg/日）**	
				投与期間終了時（M 及び F）： ・ 軽微～軽度の尿細管変性、尿細管結晶 ・ 腎臓重量の増加 ・ 血清尿素／クレアチニン上昇	**回復性試験終了時（M 及び F）** ・ 軽微な尿細管変性 ・ 腎臓重量の増加 ・ 血清クレアチニン上昇
ラット	26 週間（6 ヵ月間）（4 週間回復期間）	30	C_{max}： M：710 ng/mL F：915 ng/mL $AUC_{0\text{-}24h}$： M：4,830 h•ng/mL F：4,410 h•ng/mL	**腎臓（100 及び 200 mg/kg/日）**	
				投与期間終了時（M 及び F）： ・ 中等度～高度尿細管変性・再生 ・ 尿細管変性・再生領域における軽微～軽度の両染性結晶 ・ 軽微～軽度の尿細管過形成 ・ 中等度の間質性炎症 ・ 軽微～軽度の間質性腎線維症 ・ 血清尿素／クレアチニン上昇	**回復性試験終了（100 mg/kg/日投与群の F1 例のみ）：** ・ 中等度の尿細管変性・再生 ・ 中等度の間質性炎症 ・ 軽度の間質性腎線維症
サル	14 日間（14 日間回復期間）	1,000	C_{max}： M：3,527 ng/mL F：5,163 ng/mL $AUC_{0\text{-}24h}$： M：19,102 h•ng/mL F：31,986 h•ng/mL	なし	

動物種	投与期間	NOAEL（mg/kg/日）	BH_4 の TK パラメータ（NOAEL）	標的臓器（用量）
サル	13 週間（28 日間回復期間）	300	C_{max}： M：1,435 ng/mL F：1,345 ng/mL $AUC_{0\text{-}24h}$： M：5,652 h•ng/mL F：8,970 h•ng/mL	なし
サル	9 ヵ月間（39 週間）（4 週間回復期間）	300	C_{max}： M：3,430 ng/mL F：3,060 ng/mL $AUC_{0\text{-}24h}$： M：24,200 h•ng/mL F：14,900 h•ng/mL	なし

略語：$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、F＝雌、M＝雄、NOAEL＝無毒性量、TK＝トキシコキネティクス

4.2 遺伝毒性試験

Sepiapterin の標準的な組合わせの遺伝毒性試験が、既に完了している（モジュール 2.6.6、第 4 項）。In vitro でネズミチフス菌（*S. typhimurium*）を用いた細菌復帰突然変異試験で、sepiapterin は陰性であった（CNSA-TOX-003-2017 試験）。In vitro で培養ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験では、肝代謝系存在下で染色体異常を誘発しなかったが、肝代謝系非存在下での連続処理では、sepiapterin により染色体異常が誘発された（CNSA-TOX-004-2017 試験）。

染色体異常試験で in vitro シグナルが認められたため、in vivo でラットを用いて 2 種類のほ乳類毒性評価（小核試験及びコメット試験）を実施した（CNSA-TOX-005-2017 試験）。これら 2 つの in vivo 試験では、sepiapterin 及びその代謝物 BH_4 への曝露でいずれも陰性の結果が得られ、sepiapterin は遺伝毒性を有さないと判断された。

4.3 がん原性試験

トランスジェニックマウス［CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic］を用いて、sepiapterin のがん原性を検討した。系統、試験デザイン、及び使用用量は、FDA と協議し、発癌性評価委員会の同意を得て決定された。CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic ヘミ接合体トランスジェニックマウスを用いた 26 週間がん原性試験（PTC923-2023-070 試験）では、生存率への影響はみられず、どの用量レベルにおいても発がん作用は認められなかった（雄で検討した最高用量は 300 mg/kg/日、雌で検討した最高用量は 1,000 mg/kg/日）。また、sepiapterin を投与した動物では、sepiapterin に関連した非腫瘍性の病理組織所見も認められなかった。

独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）との合意に基づき（PMDA 対面助言 20[redacted] 年[redacted] 月[redacted] 日）、市販後に 2 年間ラットがん原性試験を提出する予定である。

包括的な WOE 評価から、sepiapterin の発がんリスクは極めて低いと結論した（モジュール 2.6.6、5.1 項）。この結論は、ヒトに関連すると考えられる製剤クラスにおいて発がん性の可能性がこれまでに示されていないこと、及び sepiapterin の以下のデータに基づいている：発がんリスクを示唆する遺伝毒性及び構造活性相関なし、トランスジェニックマウスを用いた 26 週間がん原性試験において sepiapterin 投与マウスで生存率への影響、発がん作用及び非腫瘍性の病理組織所見なし、反復投与毒性試験において前がん病変、内分泌及び生殖器の異常、免疫調節作用、及びオフターゲットの毒性を示す所見なし、局所組織反応及びその他の病態生理学的反応をもたらす未変化体及び代謝物の蓄積なし、さらに、臨床試験では、sepiapterin は治療用量で幅広い PKU 患者集団において意味のある臨床的ベネフィットが得られ、安全で忍容性も良好であることが証明されている。

4.4 生殖発生毒性

ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生、ラット及びウサギの胚・胎児発生、ラットの出生前及び出生後の発生に悪影響は認められなかった。さらに、幼若ラットを用いた毒性試験でも、sepiapterin の有害作用は認められなかった。

雌雄ラットを用いた GLP 適合受胎能及び着床までの初期胚発生試験（PTC923-2022-028 試験）では、最高 300 mg/kg/日までの用量を投与した。ラットの受胎能及び着床までの初期胚発生に対して、sepiapterin に関連した影響は認められず、NOAEL は 300 mg/kg/日であった。

妊娠ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（PTC923-2021-023 試験）では、最高 1,000 mg/kg/日の用量で妊娠日齢（GD）7 日～GD17 まで投与した。ラットの胚・胎児発生に対する有害作用は認められず、NOAEL は 1,000 mg/kg/日であった。

妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（PTC923-2021-024 試験）では、最高 1,000 mg/kg/日の用量で GD7～GD19 まで投与した。1,000 mg/kg/日群では、母動物の平均体重が GD7 から GD10 の間に一過性かつ有害ではない減少を示し、これは摂餌量の減少と対応していた。ウサギの胚・胎児発生に対する sepiapterin の有害作用は認められず、NOAEL は 1,000 mg/kg/日であった。

妊娠ラットを用いた出生前及び出生後の発生試験（PTC923-2023-048 試験）では、最高 300 mg/kg/日の用量で投与した。ラットの出生前及び出生後の発生に対して、sepiapterin に関連する影響は認められず、NOAEL は 300 mg/kg/日であった。

幼若ラットの毒性試験（PTC923-2023-045 試験）では、PND4 から PND70 まで最高 300 mg/kg/日までの用量を投与した。Sepiapterin の BH_4 への変換は、新生児ラットと成熟ラットで同程度であったが（PTC923-2020-006 試験）、PND9 での BH_4 の平均曝露量（ベースライン未補正）は、同用量（30 及び 100 mg/kg/日）を 91 日間反復投与した成熟ラットのそれぞれ約 5 倍（C_{max}）及び約 9 倍（$AUC_{0\text{-}24h}$）であった。したがって、幼若ラットの毒性試験では投与期間中の曝露量を標準化するために、sepiapterin の最高用量を PND4～PND28 までは 30 mg/kg/日、及び PND29～PND70 までは 300 mg/kg/日に設定して投与した。幼若ラットの毒性試験では、30 又は 300 mg/kg/日までの用量で、sepiapterin に関連した影響は認められなかった。PND4 の BH_4 の曝露量は、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ を指標にすると、30 mg/kg/日群（PND4 で評価した最高用量）でそれぞれ、2745 ng/mL 及び 30,950 h•ng/mL であった。PND29 の BH_4 の平均曝露量は、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ を指標にすると、300 mg/kg/日群（PND29 で評価した最高用量）でそれぞれ、4,155 ng/mL 及び 29,400 h•ng/mL であった。PND70 の BH_4 の平均曝露量は、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ を指標にすると、300 mg/kg/日群（PND70 で評価した最高用量）でそれぞれ、1,765 ng/mL and 11,550 h•ng/mL であった。

4.5 その他の毒性試験

薬物乱用性評価

Sepiapterin の潜在的な薬物乱用性の概要を記した関連データのレビューを実施した。具体的には、作用機序、薬物乱用性に関連する神経伝達物質（ドーパミン及びセロトニンなど）に対する sepiapterin と BH_4 の作用、sepiapterin の非臨床安全性データ、薬物依存に関連する可能性のある二次神経伝達物質の受容体での sepiapterin の活性、関連文献、化学合成及び製造法、並びに公表されている薬物クラス関連データ（ビオプテン顆粒）を確認した。証拠の重み付け評価（モジュール 2.6.6、8.2 項及び Appendix 2 で詳述）に基づき、sepiapterin の乱用性は極めて低いと考えられる。現在市販されている PKU 治療薬であるビオプテン顆粒は、sepiapterin と同じクラス（BH_4 調節薬）で

あり、10 年以上にわたって販売・使用されているが、依存性の兆候は示されていない。したがって、PTC は乱用性を評価するための追加試験を行う科学的妥当性はないと結論している。

不純物

毒性試験に使用したロットの不純物プロファイルは、申請する市販用製剤中のプロファイルを反映したものであった（モジュール 2.6.7、表 2.6.7.4）。

ICH M7 に準拠した(Q)SAR 評価は、sepiapterin DS の 45 種類の化合物（出発物質、中間体、及び既知/潜在的不純物）（モジュール 2.6.6、8.4.1 項）並びに sepiapterin DP 中の 4 種類の分解生成物（モジュール 2.6.6、8.4.2 項）について実施した。2 種類の化合物（CC-02 及び CC-14）は、(Q)SAR 評価ではクラス 3（警告構造、DS の構造とは無関係、変異原性データなし）と考えられ、細菌を用いる復帰突然変異試験において変異原性誘発作用は陽性であった（モジュール 2.6.6、8.4.3 項）。これらのクラス 3 の不純物の管理戦略は、3.2.S.3.2 項「不純物」に記載のように、毒性学的懸念の閾値（TTC）に加え、パージなどの追加データ、添加試験による生体内運命の評価、又は科学的リスク評価などに基づく許容摂取量に基づいて確立した。1 種類の化合物（CC-69）はクラス 2（既知の変異原性物質）とみなされ、3.2.S.3.2 項「不純物」の記載に従って管理される

Sepiapterin 原薬中の製造工程由来不純物及び製剤中の分解物で、ICH の安全性確認が必要となる閾値を超えるものについては、毒性試験で安全性が確認されている（モジュール 2.6.6、8.4.4 項）。また、遺伝毒性不純物の評価も行った。入手可能な安全性及び品質データから、市販予定の新規有効成分バッチに関連する明らかな変異原性リスクはないことが示されている。

Sepiapterin の添加剤

公表文献及び関連データベース［例：「欧州小児用製剤イニシアチブ（EuPFI）の小児における安全性及び毒性データベース」及び「米国 FDA 添加剤データベース」］に記載されている非臨床及び臨床試験からの毒性情報に基づき、小児及び成人患者の年齢別リスク評価を行った。その結果、1 日あたり最大量の sepiapterin 投与で摂取される各添加剤の 1 日総量では、安全性リスクはないと予測されると結論付けた（モジュール 2.6.6、8.4.5 項）。

光毒性試験

In vitro 光毒性試験（PTC923-2021-010 試験、モジュール 2.6.6、8.5 項）に基づくと、sepiapterin に光毒性はなかった。

5. 総括及び結論

Sepiapterin は、合成された新規化学物質であり、天然の BH_4 前駆体で内因性に生成される sepiapterin とは構造的及び生物学的に同一である。

Sepiapterin の申請適応症は、小児及び成人におけるフェニルケトン尿症である。高フェニルアラニン血症は、PAH 酵素又はその補助因子である BH_4 のいずれかの欠損により、PAH 活性が低い場合に発症する。米国及び欧州を含む世界のいくつかの国々や地域では、PKU 患者における HPA の治療に体外から投与される BH_4 が適応となっている。ただし、外因性に補充された sepiapterin は経口投与後速やかに BH_4 に変換されるため、外因性に投与される BH_4 よりも効率的に細胞内に輸送され、結果としてより効率よく BH_4 濃度を上昇させる。

Sepiapterin の効力を裏付ける試験、副次的薬理試験・安全性薬理試験、薬物動態試験、トキシコキネティクス試験及び毒性試験からなる包括的な非臨床試験プログラムを実施した。

効力を裏付ける試験は in vitro 及び in vivo で実施した。In vitro 試験では、sepiapterin が熱変性に対する PAH の安定性を改善し、PAH 酵素の活性を増強することを示した。PAH 酵素には、PKU でよく認められ BH_4 に対する感受性が低いことが知られている PAH のバリアントも含めた。In vivo 試験では、ヒトで最も高頻度で見られる変異型 PAH の 1 つを発現する *Pah-R261Q* PKU マウスモデルを含む各動物モデルを用いて、sepiapterin が生物学的活性を有することを明らかにした。*Pah-R261Q* PKU マウスモデルで評価したとき、sepiapterin の経口投与により PAH 活性が増加し、Phe 負荷後の血中 Phe 濃度が低下した。Sepiapterin のオフターゲット相互作用リスクを評価した副次的 PD 試験から、sepiapterin は検討したいずれの副次的 PD ターゲットとも臨床的に意味のある相互作用を起こす可能性は低いことが示された。安全性薬理試験では、呼吸系、心血管系及び中枢神経系機能の評価において有害作用は認められなかった。

複数の動物種（マウス、ラット、ウサギ、イヌ、マーモセット、カニクイザル）を用いて、広範かつ頑健な PK 及び TK 試験を実施した。Sepiapterin は、単回経口投与後速やかに吸収され、検討したすべての動物種で速やかに広範に BH_4 に変換された。

マウス及びラットを用いて、sepiapterin 及びその代謝物 BH_4 の分布を評価した。マウスの単回投与試験では、sepiapterin の経口投与後に、BH_4 が肝臓、腎臓及び脳に分布した。ラットでは、[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能は全身に広く分布し、ほとんどの組織で投与後 4～8 時間で最高濃度に達した。[^{14}C]-sepiapterin 由来放射能の最も高い分布が認められたのは、内分泌、代謝／排泄系組織、及び GI 管であった。

ラット及びサルに単回経口投与したときの sepiapterin の代謝は広範であった。代謝経路には、酸化／脱水素、還元／水素化、酸化的脱アミノ化、脱水、側鎖切断、メチル化などが単独又は複合的に関与していた。主要代謝経路は、ラット、サル及びヒトでほぼ同様であった。

ラット及びカニクイザルに[^{14}C]-sepiapterin を経口投与したときは、投与量の大部分が糞中から回収された。ラット及びカニクイザルともに、尿中に排泄されたのは投与量の 10%未満であった。BDC Sprague Dawley ラットでは、極めて少量（投与量の 0.55%）が胆汁を介して排泄された。

吸収後は、sepiapterin は SR（及び CR によっても）、次いで DHFR により速やかに BH_4 に変換される。BH_4 はさらに非酵素的又は酵素的代謝を受ける（Nichol 1985, Sawabe 2008, Rasmussen 2022）。BH_4 は、PAH や TH などの芳香族アミノ酸水酸化酵素の補因子として作用する場合には酸化され、生成された一部の代謝物は PCD 及び DHFR により BH_4 を再生するためにリサイクルされる可能性がある。In vitro 試験中、sepiapterin は CYP450 介在性の PK 薬物相互作用を示唆する徴候を示さなかった。Sepiapterin は、CYP450 アイソザイム 1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4 を阻害しない（50 µM までの濃度）。また、CYP450 アイソザイム 1A2、2B6 及び 3A4 を誘導しない（10 µM までの濃度）。また、in vitro において、sepiapterin 及び BH_4 はいずれも BCRP を阻害する（IC_{50} はそれぞれ、647.7 µM 及び 778.4 µM）。また、sepiapterin 及び BH_4 はいずれも BCRP の基質である。BH_4 は MDR1（P-gp とも呼ばれる）の基質であるが、sepiapterin は基質ではない。

Sepiapterin の安全性を野生型 CByB6F1-Tg（HRAS）2Jic マウスに 28 日間、ラットに最長 26 週間連続、及びサルに最長 9 ヵ月間（39 週間）連日経口投与することにより評価した。ラット 13 週間及び 26 週間試験では、腎臓でのみ sepiapterin の毒性学的に重要な所見が認められた。また、sepiapterin の遺伝毒性試験、生殖毒性試験、幼若動物毒性試験及び光毒性試験も実施した。これらの試験で有害所見は認められなかった。CByB6F1 Tg(HRAS)2Jic ヘミ接合体トランスジェニックマウスを用いた 26 週間がん原性試験において、生存率への影響はなく、発がん作用及び非腫瘍性所見は認められなかった。

包括的な WOE 評価から、sepiapterin 及び BH_4 の発がん性は低く、sepiapterin の乱用可能性は極めて低いと思われると結論した。

非臨床毒性試験プログラムにおいて毒性学的に重要な所見は、ラットの 13 週間及び 26 週間試験における腎臓の所見のみであった。100 mg/kg/日以上（26 週間試験）及び 300 mg/kg/日（13 週間試験）で、腎集合管に結晶沈着を伴う腎尿細管の変性・再生が認められた。13 週間試験では、300 mg/kg/日での腎臓の変化は部分的に可逆的であり、26 週間試験では、腎臓の変化は部分的（100 mg/kg/日）～完全に（200 mg/kg/日）可逆的であった。13 週間及び 26 週間試験で認められた血清尿素及び血清クレアチニンの増加は、可逆的であった。26 週間試験では、結晶沈着は軽微～軽度の尿細管上皮細胞過形成（単純性過形成）を伴っていた。単純尿細管過形成は、一般的に増殖尿細管細胞の単層細胞として観察され、化合物誘発性尿細管変性に関連する反応、又は細胞傷害領域における再生性若しくは反応性過形成として認められ、腎臓の尿細管ネフロン系全体に認められることがある（Frazier 2012）。したがって、ラット 26 週間試験でみられたこの単純性過形成は、腎臓における炎症及び結晶の存在に対する反応・適応性反応に続発したものと判断される。結晶がもはや存在しない回復動物では、乳頭管過形成病変が認められなかったことから、この所見は反応性・適応性であることが裏付けられた。重要なことは、この種の単純性尿細管過形成は、結晶が無くなれば、完全に可逆的となり正常な形態となり、前腫瘍性変化ではないと判断される。腎臓の病理専門家は、尿細管過形成は単純性で前腫瘍性ではないと結論した（PTC923-2020-003「病理専門家の報告書」）。

結晶尿は、実験動物及びヒトで発生し、時に二次性腎症を伴うことがある（Perazella and Herlitz 2021）。高濃度のイオン及び分子が尿管を移動することにより基質過飽和及び結晶核形成の可能性が高まり、そのために腎内で結晶沈着が起きる。固有の特性により、結晶は腎外で析出し、腎内に沈着する。結晶尿が生じる曝露量の評価は、ヒトにおける結晶尿及び結晶尿の後遺症のリスクを検討するのに不可欠である。

腎臓の解剖学的構造に違いがあるため（ヒトは多乳頭、げっ歯類は単乳頭）、様々な腎毒素に対する反応には、動物種間及び性別間でも顕著な差が認められることが多い。化学物質又はその代謝物は、ヘンレ係蹄及び遠位ネフロンで濃縮されるため、尿細管内腔で結晶化することがある。ラットの系統によって尿路結石の生じ易さが異なり、これが薬剤誘発性結晶形成のし易さに反映される可能性がある（Tannehill-Gregg 2009）。尿中タンパク質濃度、イオン濃度（カルシウム、マグネシウム、リン酸塩）及び pH などの尿の特性も結晶形成に影響する可能性がある。げっ歯類はヒトよりも尿中のタンパク質濃度がはるかに高く、このタンパク質が尿ろ液中の原薬の溶解性に影響を及ぼすだけでなく、結晶形成の核として作用する可能性がある。ラット及びマウスの尿の浸透圧は 1500～2,650 mOsmol/Kg H_2O であるが、ヒトの浸透圧は通常 650 mOsmol/Kg H_2O である（Yang and Bankir 2005）。げっ歯類とヒトの腎臓の生理及び病理の違いを考慮すると、ラット 26 週間試験で認められた腎臓所見の意義は不明である。

ラット 6 ヵ月間投与試験で、100 mg/kg/日以上の用量で腎集合管に、結晶沈着を伴う尿細管変性・再生がみられた。このときの BH_4 の平均曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$、雌雄）はそれぞれ、1,725 ng/mL 及び 11,795 h•ng/mL で、最大推奨臨床用量（MRHD）での C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ のそれぞれ、約 5 倍及び約 4 倍に相当する。

ラットで見られた腎臓の所見は、用量及び曝露量に比例しており、30 mg/kg/日では所見が認められなかった。このときの BH_4 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$（雌雄）はそれぞれ、810.5 ng/mL 及び 4,620 h•ng/mL であり、安全域は C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ で MRHD のそれぞれ約 2.4 倍及び約 2 倍であった。一方、マーモセットの 9 ヵ月間投与試験では 300 mg/kg/日までの用量で腎臓の所見は認められず、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ に基づく MRHD との曝露量比はそれぞれ、約 9.5 倍及び約 6 倍であった。

さらに、これまでに実施された初期～後期臨床試験の安全性データからは、MRHD での sepiapterin 投与によるヒトにおける腎リスクは示されていない。

MRHD（60 mg/kg/日）での臨床曝露量と比較した NOAEL/NOEL での BH_4 曝露量（倍数）を Table 3 に要約する。曝露マージンは、60 mg/kg/日で投与された PKU 患者で報告された全身曝露量（C_{max}＝343 ng/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$＝2,990 h•μg/mL）に対する動物で得られた（性別ごとの試験終了時）ベースライン未補正の BH_4 の全身曝露量の比に基づいて求めた。

Table 3. 臨床用量 60 mg/kg/日で得られた臨床 BH_4 曝露量に対する非臨床 BH_4 曝露量（倍数）の要約

試験期間	動物種	性別	NOAEL/NOEL（mg/kg/日）	$AUC_{0\text{-}24h}$（h•ng/mL）	$AUC_{0\text{-}24h}$ マージン	C_{max}（ng/mL）	C_{max} マージン
26 週間	ラット	M	30[a]	4,830	2	710	2
		F	30[a]	4,410	2	915	3
9 ヵ月（39 週間）	マーモセット	M	300	24,200	8	3,430	10
		F	300	14,900	5	3,060	9
FEED[c]	ラット	M	300	23,100[b]	8	2,750[b]	8
		F	300	20,900[b]	7	3,630[b]	11
GD7～GD17	妊娠ラット	F	1,000	26,900	9	3,410	10
GD7～GD19	妊娠ウサギ	F	1,000	16,300	6	2,310	7
PPND[d]	ラット	F	300	20,900[b]	7	3,630[b]	11
幼若動物毒性試験：PND4～PND70（PND70 時）	ラット	M	300	12,300	4	1,750	5
		F	300	10,800	4	1,780	5
26 週間がん原性	マウス	M	300	34,500	11	5,180	15
		F	1,000	46,900	16	6,340	18
第 3 相臨床試験（PTC923-MD-003-PKU）	ヒト	M＋F	-	2,990	-	343	-

略語：$AUC_{0\text{-}24h}$＝投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度曲線下面積、BH_4＝テトラヒドロビオプテリン、F＝雌、FEED＝受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、GD＝妊娠日齢、M＝雄、NOAEL＝無毒性量、NOEL＝無影響量、PND＝生後日齢、PPND＝出生前及び出生後の発生試験、Preg＝妊娠

[a] NOEL 用量

[b] 300 mg/kg/日を投与したラット 13 週間毒性試験から得られた曝露量データ。ラットを用いた 13 週間試験と 14 日間試験における曝露量は同程度であった。

[c] Sepiapterin を雄ラットに同居 28 日前から同居期間中及び継続して安楽死前日まで、雌ラットでは同居前 15 日間、同居期間中及び継続して GD7 まで 1 日 1 回強制経口投与した。

[d] 妊娠ラットに対し、GD6～生後 20 日目まで（同腹仔を産んだラット）又は GD24 まで（同腹仔を産まなかったラット）に sepiapterin を 1 日 1 回強制経口投与した。

注：マージン＝（NOAEL での動物の $AUC_{0\text{-}24h}$ [h•ng/mL]）/（60 mg/kg/日でのヒトの $AUC_{0\text{-}24h}$ [h•ng/mL]）

結論として、sepiapterin の非臨床試験のデータから、申請適応症を裏付ける薬理学的特性、及び非臨床動物種においてヒトと類似した薬物動態特性が示され経口投与が支持された。また、PKU の治療で予定している最高臨床用量 60 mg/kg/日での sepiapterin の使用を支持する安全性プロファイルも示された。

6. 参考文献

Al Hafid, N and Christodoulou, J. Phenylketonuria: A Review of Current and Future Treatments. Transl Pediatr 2015;4(4):304-317.

Ashe, K, Kelso, W, Farrand, S, Panetta, J, Fazio, T, De Jong, G and Walterfang, M. Psychiatric and Cognitive Aspects of Phenylketonuria: The Limitations of Diet and Promise of New Treatments. Front Psychiatry 2019;10:561.

Aubi, O, Prestegard, KS, Jung-Kc, K, Shi, TS, Ying, M, Grindheim, AK, et al. The Pah-R261Q mouse reveals oxidative stress associated with amyloid-like hepatic aggregation of mutant phenylalanine hydroxylase. Nat Commun 2021;12(1):2073.

Bartus, A, Palasti, F, Juhasz, E, Kiss, E, Simonova, E, Sumanszki, C and Reismann, P. The Influence of Blood Phenylalanine Levels on Neurocognitive Function in Adult PKU Patients. Metab Brain Dis 2018;33(5):1609-1615.

Blau, N and Longo, N. Alternative Therapies to Address the Unmet Medical Needs of Patients With Phenylketonuria. Expert Opin Pharmacother 2015;16(6):791-800.

Blau, N, Shen, N and Carducci, C. Molecular Genetics and Diagnosis of Phenylketonuria: State of the Art. Expert Rev Mol Diagn 2014;14(6):655-671.

Burnett, JR. Sapropterin Dihydrochloride (Kuvan/Phenoptin), an Orally Active Synthetic Form of BH_4 for the Treatment of Phenylketonuria. IDrugs 2007;10(11):805-813.

Caletti, MT, Bettocchi, I, Baronio, F, Brodosi, L, Cataldi, S, Petroni, ML, et al. Maternal PKU: Defining Phenylalanine Tolerance and Its Variation During Pregnancy, According to Genetic Background. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2020;30(6):977-983.

Camp, KM, Parisi, MA, Acosta, PB, Berry, GT, Bilder, DA, Blau, N, et al. Phenylketonuria Scientific Review Conference: State of the Science and Future Research Needs. Mol Genetics Metab 2014;112(2):87-122.

Cohen, SM. Crystalluria and Chronic Kidney Disease. Toxicol Pathol 2018;46(8):949-955.

de Baulny, HO, Abadie, V, Feillet, F and de Parscau, L. Management of Phenylketonuria and Hyperphenylalaninemia. J Nutr 2007;137(6 Suppl 1):1561S-1563S; discussion 1573S-1575S.

Flydal, MI, Alcorlo-Pages, M, Johannessen, FG, Martinez-Caballero, S, Skjaerven, L, Fernandez-Leiro, R, et al. Structure of Full-Length Human Phenylalanine Hydroxylase in Complex With Tetrahydrobiopterin. Proc Natl Acad Sci U S A 2019;116(23):11229-11234.

Frazier, KS, Seely, JC, Hard, GC, Betton, G, Burnett, R, Nakatsuji, S, et al. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Urinary System. Toxicol Pathol 2012;40(4 Suppl):14S-86S.

Gersting, S, Barroso, M, Etzold, S and Smith, N. The Effects of the Pharmacological Chaperone Sepiapterin on Phenylalanine Hydroxylase Activity of Common Variants in Phenylketonuria. Genetics in Medicine Open 2023;1(1):17.

Gersting, SW, Kemter, KF, Staudigl, M, Messing, DD, Danecka, MK, Lagler, FB, et al. Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. Am J Hum Genet 2008;83(1):5-17.

Gersting, SW, Staudigl, M, Truger, MS, Messing, DD, Danecka, MK, Sommerhoff, CP, et al. Activation of phenylalanine hydroxylase induces positive cooperativity toward the natural cofactor. J Biol Chem 2010;285(40):30686-30697.

Hasegawa, H, Sawabe, K, Nakanishi, N and Wakasugi, OK. Delivery of Exogenous Tetrahydrobiopterin (BH_4) to Cells of Target Organs: Role of Salvage Pathway and Uptake of Its Precursor in Effective Elevation of Tissue BH_4. Mol Genetics Metab 2005;86 Suppl 1:S2-S10.

Hasegawa, H, Yamamoto, K, Sawabe, K, Matsuhashi, Y, Oguro, K, Wakasugi, OK and Nakanishi, N (2002). Cells Take up BH4, Oxidize It and the Oxidized Biopterin is Preferentially Released. In Chemistry and Biology of Pteridines and Folates: Proceedings of the 12th International Symposium on Pteridines and Folates, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, June 17–22, 2001. S. Milstien, G. Kapatos, R. A. Levine and B. Shane; Boston, MA, Springer US:205-210.

Hillert, A, Anikster, Y, Belanger-Quintana, A, Burlina, A, Burton, BK, Carducci, C, et al. The Genetic Landscape and Epidemiology of Phenylketonuria. Am J Hum Genet 2020;107(2):234-250.

Hoshiga, M, Hatakeyama, K, Watanabe, M, Shimada, M and Kagamiyama, H. Autoradiographic Distribution of [^{14}C]tetrahydrobiopterin and Its Developmental Change in Mice. J Pharmacol Exp Ther 1993;267(2):971-978.

ICH. (1994). "S3A: Toxicokinetics: A Guidance for Assessing Systemic Exposure in Toxicology Studies." from https://database.ich.org/sites/default/files/S3A_Guideline.pdf.

ICH. (1998). "S4: Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Non Rodent Toxicity Testing)." from https://database.ich.org/sites/default/files/S4_Guideline.pdf.

ICH. (2000). "S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals." from https://database.ich.org/sites/default/files/S7A_Guideline.pdf.

ICH. (2005). "S7B: The Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals." from https://database.ich.org/sites/default/files/S7B_Guideline.pdf.

ICH. (2006a). "Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances." from https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf.

ICH. (2006b). "Q3B(R2): Impurities in New Drug Products." from https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf.

ICH. (2009). "M3(R2): Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals." from https://database.ich.org/sites/default/files/M3_R2__Guideline.pdf.

ICH. (2012). "S2(R1): Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use." from https://database.ich.org/sites/default/files/S2_R1_Guideline.pdf.

ICH. (2020a). "S5(R3): Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals." from https://database.ich.org/sites/default/files/S5-R3_Step4_Guideline_2020_0218.pdf.

ICH. (2020b). "S11: Nonclinical Safety Testing In Support of Development of Paediatric Pharmaceuticals." from https://database.ich.org/sites/default/files/S11_Step4_FinalGuideline_2020_0310.pdf.

ICH. (2023). "M7(R2): Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk." from https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7%28R2%29_Guideline_Step4_2023_0216_0.pdf.

Levy, HL, Milanowski, A, Chakrapani, A, Cleary, M, Lee, P, Trefz, FK, et al. Efficacy of Sapropterin Dihydrochloride (Tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for Reduction of Phenylalanine Concentration in Patients With Phenylketonuria: A Phase III Randomised Placebo-Controlled Study. Lancet 2007;370(9586):504-510.

MacDonald, A, van Rijn, M, Feillet, F, Lund, AM, Bernstein, L, Bosch, AM, et al. Adherence Issues in Inherited Metabolic Disorders Treated by Low Natural Protein Diets. Ann Nutr Metab 2012;61(4):289-295.

Macleod, EL and Ney, DM. Nutritional Management of Phenylketonuria. Ann Nestle Eng 2010;68(2):58-69.

Nichol, C, Smith, G and Duch, D. Biosynthesis and Metabolism of Tetrahydrobiopterin and Molybdopterin. Ann. Rev. Biochem. 1985;54:729-764.

Ohashi, A, Sugawara, Y, Mamada, K, Harada, Y, Sumi, T, Anzai, N, et al. Membrane Transport of Sepiapterin and Dihydrobiopterin by Equilibrative Nucleoside Transporters: A Plausible Gateway for the Salvage Pathway of Tetrahydrobiopterin Biosynthesis. Mol Genetics Metab 2011;102(1):18-28.

Perazella, MA and Herlitz, LC. The Crystalline Nephropathies. Kidney Int Rep 2021;6(12):2942-2957.

Pey, AL, Perez, B, Desviat, LR, Martinez, MA, Aguado, C, Erlandsen, H, et al. Mechanisms Underlying Responsiveness to Tetrahydrobiopterin in Mild Phenylketonuria Mutations. Hum Mutat 2004;24(5):388-399.

proteinatlas.org. "The Human Protein Atlas." 2024, from http://www.proteinatlas.org.

Rasmussen, L, Foulks, Z, Burton, C and Shi, H. Establishing Pteridine Metabolism in a Progressive Isogenic Breast Cancer Cell Model. Metabolomics 2022;18(2). https://doi.org/10.1007/s11306-021-01861-9.

Sawabe, K, Suetake, Y, Nakanishi, N, Wakasugi, KO and Hasegawa, H. Cellular Accumulation of Tetrahydrobiopterin Following Its Administration is Mediated by Two Different Processes; Direct Uptake and Indirect Uptake Mediated by a Methotrexate-Sensitive Process. Mol Genet Metab 2005;86 Suppl 1:S133-138.

Sawabe, K, Wakasugi, KO and Hasegawa, H. Tetrahydrobiopterin Uptake in Supplemental Administration: Elevation of Tissue Tetrahydrobiopterin in Mice Following Uptake of the Exogenously Oxidized Product 7,8-Dihydrobiopterin and Subsequent Reduction by an Anti-Folate-Sensitive Process. J Pharmacol Sci 2004;96(2):124-133.

Sawabe, K, Yamamoto, K, Harada, Y, Ohashi, A, Sugawara, Y, Matsuoka, H and Hasegawa, H. Cellular Uptake of Sepiapterin and Push-Pull Accumulation of Tetrahydrobiopterin. Mol Genetics Metab 2008;94(4):410-416.

Sawabe, K, Yamamoto, K, Kamata, T, Wakasugi, KO and Hasegawa, H (2002). Sepiapterin Administration Raises Tissue BH4 Levels More Efficiently Than BH4 Supplementation in Normal Mice. In Chemistry and Biology of Pteridines and Folates. S. Milstein, G. Kapatos, R. A. Levine and B. Shane; Boston, Springer:199-204.

Scriver, CR and Kaufman, S (2001). Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly and R. Childs; New York, USA, McGraw-Hill Inc:1667-1724.

Smith, I and Lee, P (2000). The Hyperphenylalaninemias. Berlin; Springer.

Smith, N, Longo, N, Levert, K, Hyland, K and Blau, N. Phase I Clinical Evaluation of CNSA-001 (Sepiapterin), a Novel Pharmacological Treatment for Phenylketonuria and Tetrahydrobiopterin Deficiencies, in Healthy Volunteers. Mol Genetics Metab 2019;126(4):406-412.

Tannehill-Gregg, SH, Dominick, MA, Reisinger, AJ, Moehlenkamp, JD, Waites, CR, Stock, DA, et al. Strain-Related Differences in Urine Composition of Male Rats of Potential Relevance to Urolithiasis. Toxicol Pathol 2009;37(3):293-305.

Thony, B, Ding, Z and Martinez, A. Tetrahydrobiopterin Protects Phenylalanine Hydroxylase Activity In Vivo: Implications For Tetrahydrobiopterin-Responsive Hyperphenylalaninemia. FEBS Lett 2004;577(3):507-511.

Trunzo, R, Santacroce, R, D'Andrea, G, Longo, V, De Girolamo, G, Dimatteo, C, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency in south Italy: Genotype-phenotype correlations, identification of a novel mutant PAH allele and prediction of BH4 responsiveness. Clin Chim Acta 2015;450:51-55.

Waisbren, SE, Noel, K, Fahrbach, K, Cella, C, Frame, D, Dorenbaum, A and Levy, H. Phenylalanine Blood Levels and Clinical Outcomes in Phenylketonuria: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. Mol Genet Metab 2007;92(1-2):63-70.

Werner, ER, Blau, N and Thony, B. Tetrahydrobiopterin: Biochemistry and Pathophysiology. Biochem J 2011;438(3):397-414.

Wu, Y, Chen, P, Sun, L, Yuan, S, Cheng, Z, L., L, et al. Sepiapterin Reductase: Characteristics and Role in Diseases. J Cell Mol Med 2020;24:9495-9506.

Yamamoto, K, Nagano, M, Nakanishi, N and Hasegawa, H. A Comparison of Sepiapterin and Tetrahydrobiopterin Uptake by BRL2H3 Cells. Pteridines 1996;7(4):154-156.

Yang, B and Bankir, L. Urea and Urine Concentrating Ability: New Insights From Studies in Mice. Am J Physiol Renal Physiol 2005;288(5):F881-F896.